

平成30年9月3日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460532

研究課題名(和文) マダニ媒介性新興感染症起因の難培養性アナプラズマ科細菌を標的としたメタゲノム解析

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of uncultured Anaplasmataceae pathogen from a single tick in Japan

研究代表者

大橋 典男 (Ohashi, Norio)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10169039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アナプラズマ科細菌には、ヒトに発熱性疾患を引き起こす *Anaplasma phagocytophilum* が知られているが、この病原体は分離が極めて困難なため、国内の分離株は得られておらず、日本の *A. phagocytophilum* のゲノム情報は存在しない。そこで本研究では、アナプラズマ科細菌を保有する媒介マダニの検体から、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、国内における *A. phagocytophilum* のゲノムのほぼ全長である1.48 Mbの解読に成功した。得られた知見は、アナプラズマ科細菌の簡易検出ツールや遺伝子診断法の開発へと繋がり、公衆衛生上、多大な社会貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA) is an emerging infectious disease and caused by *Anaplasma phagocytophilum*, that infects primarily neutrophils. In Japan, we do not have any Japanese *A. phagocytophilum* isolate, because its isolation from patients is extremely difficult. In this study, therefore we attempted the metagenomic analysis to obtain the genome sequence of uncultured *A. phagocytophilum* from a single *Ixodes persulcatus* tick using several next-generation and third-generation sequencers such as ION PGM System, MiSeq, HiSeq, and MinION. Eventually, we successfully obtained almost full-length genome sequence with 1.48 Mb of the uncultured *A. phagocytophilum* in Japan using the whole-genome amplification DNA from salivary glands of the single tick. Thus, we believe that the genome sequence of Japanese *A. phagocytophilum* obtained in this study will contribute the development of molecular-based HGA-diagnostic tool for public health significance.

研究分野：微生物学

キーワード：メタゲノム 細菌 新興感染症 *Anaplasma* マダニ媒介

1. 研究開始当初の背景

アナプラズマ科細菌には、アナプラズマ属、エーリキア属、ネオエーリキア属などの細菌が含まれており、これらのほとんどはマダニにより媒介される。このうち、ヒトに発熱性疾患を引き起こすものとして、「ヒト顆粒球アナプラズマ症」病原体の *Anaplasma phagocytophilum*、「ヒト単球エーリキア症」病原体の *Ehrlichia chaffeensis*、および「ネオエーリキア症」病原体の *Neoehrlichia mikurensis* が知られている。これらの疾患はすべて新興感染症である。日本国内では、特に、ヒト顆粒球アナプラズマ症の患者が見出されていることから、その病原体の *A. phagocytophilum* が重要となる。また、家畜の感染症の原因細菌としては、*A. centrale* や *A. bovis* も日本国内に存在していることが明らかとなっている。

「ヒト顆粒球アナプラズマ症」は、1994年に米国で発見され、1996年にその起因細菌の *A. phagocytophilum* が分離報告された。*A. phagocytophilum* は偏性寄生性細菌で、顆粒球（特に好中球）に主に感染し、細胞質中の寄生性空胞内で増殖して、マイクロコロニー（モルラ）を形成する。日本国内の *A. phagocytophilum* については、2005年まで、その存在がまったく不明であったが、我々の調査で国内の *Ixodes* 属のマダニが *A. phagocytophilum* を保有していることが明らかとなった。その後、我々は、日本国内の「ヒト顆粒球アナプラズマ症」の患者を初めて見出した。米国においては、すでに患者分離株のゲノム情報が得られているが、日本においては分離株が得られていないため、国内の *A. phagocytophilum* のゲノムに関する知見が全く存在しない。

2. 研究の目的

日本においては、*A. phagocytophilum* の分離株がまだ得られていないことから、本研究では、難培養性アナプラズマ科細菌を保有する媒介マダニの検体を用いて、近年技術進歩がめざましい次世代・第3世代シーケンサーを利用したメタゲノム解析により、マダニ内細菌群のゲノム情報を蓄積することを目的とした。本研究で得られる知見は、アナプラズマ科細菌の簡易検出ツールや遺伝子診断法の開発などへと繋がり、公衆衛生上、大きな社会貢献が期待できる。

3. 研究の方法

我々は、これまでに、2,000匹以上のマダニ個体を調査し、アナプラズマ科細菌の遺伝子検出に成功している。その中で、特に2匹のシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) の唾液腺内に多量の *A. phagocytophilum* が存在していることを突き止めた。そして、このマダニ宿主DNA混ざりの全DNAを GenomiPhi V2によりまるごと増幅して、long-PCR-サンガ法により、この2個体の

唾液腺内に存在する *A. phagocytophilum* の約4kbの配列の解読に成功した (Wuritu, Ohashi et al., J Med Microbiol, 2009)。本研究では、この2個体について、まずメタ16S解析を行った。その結果、そのうちの1個体 (T162) がより多くの *A. phagocytophilum* を保有していることが判った。そこで、この1個体 (T162) の GenomiPhi 増幅した唾液腺DNAを種々の方法で断片化し、ION PGM System (ThermoFisher社製)、MiSeqとHiSeq (Illumina社製) および MinION (Oxford Nanopore社製) の次世代・第3世代シーケンサーを用いて、メタゲノム解析を行い、様々なソフトウェアで *in silico* 解析を行った。

4. 研究成果

ION PGM Systemの解析においては、トータルで1,730,785リードが得られ、トリミングの後、BWAにより、マダニ配列を除去した1,174,629リードについて Megablast 検索を行った。その結果、*A. phagocytophilum*、*Rickettsia*、*Borrelia*、未知の Endosymbiont などの種々の細菌DNAのリードが得られた。特に *A. phagocytophilum* のリード数は全リード数の約5%に相当する87,781リードであることが判った。1リードが平均200bpで、*A. phagocytophilum*の各種菌株のゲノムサイズがおよそ1.5Mbであることから、平均 read depthはx12ほどと予想された。このION PGM Systemは、single-endリードで、ランダムに塩基の挿入欠失のエラーがあること、およびさらに read depthを増加させるために、より精度の高いペアエンド配列が取得可能なMiSeqとHiSeqでの解析を行った。MiSeqでは、平均250bpのトータル47,864,648リードが得られ、トリミング後、マダニ配列の除去を行い、3,010,728リード(1,505,364ペア)を得た。Megablast検索から、72,706リードが *A. phagocytophilum* ゲノムにヒットした。また、de novo アッセンブルを実施し、得られた613 contigs (N50=10,903)のBLAST検索から、193 contigs (max contig length = 32,313 bp, average length = 7,202 bp, average read depth = x20, total contig size = 1,390,048 bp)が *A. phagocytophilum* ゲノムに相当することが判った。しかし、他の *A. phagocytophilum* 分離株の1.5Mbよりゲノムサイズが小さいことから、取りこぼしがあるものと思われた。さらに、read depthも十分でなかったため、その後、HiSeqでの解析を行った。その結果、平均150bpのトータル824,492,272リードを得ることができ、トリミング後、マダニ配列の除去を行い、97,240,658リード(48,620,329ペア)を得た。このうち、2,041,634リードが *A. phagocytophilum* ゲノムのものであった。続いて、long readが取得可能なMinIONによる解析も実施した。その結果、平均2,451bpのトータル832,992リードが得られた。このうち、14,461リード (average read length =

1,890 bp, max read length = 45,621 bp) が *A. phagocytophilum* ゲノムのものであった。次に、マダニ内の *A. phagocytophilum* T162 のドラフトゲノムを得るため、T162 株と近縁と推定される *A. phagocytophilum* JM 株をリファレンスとして、マダニ配列除去後の MinION、MiSeq、HiSeq のリードを用いてマッピングを行った。その結果、下図に示すように、約 1.48 Mb (average read depth = x 433) の *A. phagocytophilum* T162 ドラフトゲノム配列を得ることができた。JM 株と T162 のゲノムレベルでの相同性はおよそ 98% であると推定される。

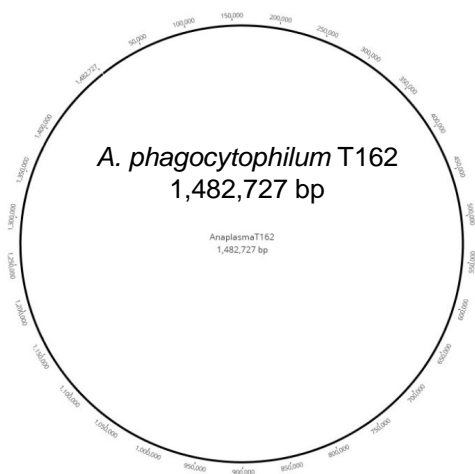


図. *A. phagocytophilum* T162 のドラフトゲノムマップ

現在、マダニ配列を除去したすべてのリードについて、BWA、Velvet、SPAdesなどを駆使し、de novo アッセンブルを進めており、僅かに残った gap のクローズを実施したいと考えている。また、Endosymbiont についても解析を進めている。*Ixodes* 属の Endosymbiont については、米国の黒足マダニ (*I. scapularis*) の *Candidatus* Midichloria mitochondrii の全ゲノム配列のみがデータベースに登録されている。本研究のシュルツェマダニの Endosymbiont と *M. mitochondrii* の相同性は、75-78%ほどと推定されるが、相同性が低いいため、*M. mitochondrii* をリファレンスとしたマッピング法が利用できない。この Endosymbiont は *A. phagocytophilum* T162 より約 10 倍以上多くマダニ内に存在していることから、現在、de novo アッセンブルと BLAST 検索を駆使して、シュルツェマダニの Endosymbiont のリードを取得しており、その後、in silico ゲノム解析を進める予定である。

以上、本研究のメタゲノム解析は、マダニ 1 個体からの唾液腺から、そこに内在するアナプラズマ科細菌群のゲノム配列を解読するという、極めて独創的研究である。得られた知見は、今後のメタゲノム方法論の発展にも大きく貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Kawamori F, Shimazu Y, Sato H, Monma N, Ikegaya A, Yamamoto S, Fujita H, Morita H, Tamaki Y, Takamoto N, Su H, Shimada S, Shimamura Y, Masuda S, Ando S, Ohashi N. Evaluation of diagnostic assay for rickettsioses using duplex real-time PCR in multiple laboratories in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2018 Apr 27 査読有, DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.447. [Epub ahead of print]
2. Gaowa, Wulantuya, Yin X, Cao M, Guo S, Ding C, Lu Y, Luo J, Kawabata H, Ando S, Su H, Shimada M, Takamoto N, Shimamura Y, Masuda S, Ohashi N. Case of human infection with *Anaplasma phagocytophilum* in Inner Mongolia, China. *Jpn J Infect Dis*. 71, 155-157 (2018) 査読有, DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.450.
3. Iwai K, Yoshikawa Y, Miyoshi N, Fukutomi R, Asada K, Ohashi N. Effects of short-term intake of wheat bran with different particle sizes on the murine intestinal environment. *Food Sci Technol Res*. 23, 733-742 (2017) 査読有, DOI: 10.3136/fstr.23.733.
4. Yamano K, Ito T, Kiyonagi K, Yamazaki H, Sugawara M, Saito T, Ohashi N, Zamoto-Niikura A, Sato K, Kawabata H. Case report: Clinical features of a case of suspected *Borrelia miyamotoi* disease in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 97, 84-87 (2017) 査読有, DOI: 10.4269/ajtmh.16-0699.
5. Waki N, Kuwabara Y, Yoshikawa Y, Suganuma H, Koide H, Oku N, Ohashi N. Amelioration of *Citrobacter rodentium* proliferation in early stage of infection in mice by pretreatment with *Lactobacillus brevis* KB290 and verification using in vivo bioluminescence imaging. *FEMS Microbiol. Lett*. 2017 Mar 1;364(6). 査読有, DOI: 10.1093/femsle/fnw254
7. Sakakibara Y, Sen E, Sato K, Kawabata H, Ohashi N, Masuzawa T: Detection and characterization of emerging relapsing fever pathogen, *Borrelia miyamotoi*, from *Ixodes ricinus* tick on rural Thrace (Thrace) region of north western Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 16:797-799 (2016) 査読有, DOI: 10.1089/vbz.2016.2012

8. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Takano A, Kawabata H, Ohashi N, Masuzawa T: Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* in Irkutsk City and its neighboring territories, Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 394-397 (2016) 査読有, DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.12.016.
9. Wu, D., Wuritu, Yoshikawa, Y., Gaowa, Kawamori, F., Ikegaya, A., Ohtake, M., Ohashi, M., Shimada, M., Takada, A., Iwai, K., Ohashi, N.: Molecular and serological survey of *Rickettsiales* bacteria in wild sika deer (*Cervus nippon nippon*) in Shizuoka prefecture, Japan: High prevalence of *Anaplasma* species. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68, 434-437 (2015) DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.003.
12. 大橋典男: 話題の疾患と治療「ヒト顆粒球アナプラズマ症」, 感染・炎症・免疫 45, 74-77 (2015)
13. Gaowa, Yoshikawa, Y., Ohashi, N., Wu, D., Kawamori, F., Ikegaya, A., Watanabe, T., Saitoh, K., Takechi, D., Murakami, Y., Shichi, D., Aso, K., and Ando, S.: *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in humans, Japan, 2010-2011. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 508-509 (2014) DOI: 10.3201/eid2003.131337

[学会発表](計 29 件)

1. 佐藤綾香, 高本直矢, 高野愛, 大石沙織, 阿部冬樹, 神田隆, 平良雅克, 藤田博己, 島村裕子, 大橋典男: マダニ内在性細菌群のメタ 16S 解析から見る *Coxiella* と *Rickettsia*, 第 91 回日本細菌学会総会(福岡), 2018 年 3 月 27 日-29 日.
2. 田井仁, 高本直矢, 藤田博己, 島田雅彦, 蘇泓如, 大橋典男: *Rickettsia* sp. LON の細胞内増殖評価法の検討, 第 24 回リケッチア研究会(東京), 2017 年 12 月 2-3 日.
3. 高本直矢, 田井仁, 佐藤寛子, 平良雅克, 高野愛, 高田伸弘, 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 大石沙織, 阿部冬樹, 神田隆, 藤田博己, 大橋典男: 単為生殖がもたらすダニ内在性リケッチアへの影響, 第 24 回リケッチア研究会(東京), 2017 年 12 月 2-3 日.
4. 佐藤綾香, 高本直矢, 笹原榛華, 松崎光ノ介, 高野愛, 大石沙織, 阿部冬樹, 神田隆, 平良雅克, 藤田博己, 島村裕子, 増田修一, 大橋典男: マダニ内に存在する細菌叢のメタ 16S 解析, 第 24 回リケッチア研究会(東京), 2017 年 12 月 2-3 日.
5. Ohashi N, Gaowa, Wuritu, Wu D, Kawamori F, Su H, Shimada M, Takamoto N, Tai H, Ando S. *Anaplasma phagocytophilum* in Japan., International Congress on

- Rickettsiae* and other Intracellular Bacteria (Marseille, France), June 19-21 (2017)
6. 大橋典男: アナプラズマ症, 第 90 回日本細菌学会総会 シンポジウム(仙台), 2017 年 3 月 19 日-21 日.
 7. 高本直矢, 田井仁, 佐藤寛子, 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 高田伸弘, 大橋典男: マダニ内在性細菌群の *Rickettsia* は異常な生殖系統の宿主で消えていく, 第 90 回日本細菌学会総会 ワークショップ(仙台), 2017 年 3 月 19 日-21 日.
 8. 島田雅彦, 蘇泓如, 大橋典男: RF6/A 感染細胞における *Anaplasma phagocytophilum* の P44 外膜蛋白質群の発現解析, 第 90 回日本細菌学会総会(仙台), 2017 年 3 月 19 日-21 日.
 9. 蘇泓如, 伊藤圭祐, 河原崎泰昌, 島田雅彦, 大橋典男: P44-specific peptide antigens for serodiagnosis of human granulocytic anaplasmosis, 第 90 回日本細菌学会総会(仙台), 2017 年 3 月 19 日-21 日.
 10. 島田雅彦, 蘇泓如, 大橋典男: アナプラズマ感染における異なる宿主細胞の live imaging, 第 23 回リケッチア研究会(東京), 2016 年 12 月 3-4 日.
 11. 池ヶ谷朝香, 原稔美, 酒井悠希子, 阿部冬樹, 佐原啓二, 大橋典男: マダニから抽出した RNA の紅斑熱群リケッチア検査への活用について, 第 23 回リケッチア研究会(東京), 2016 年 12 月 3-4 日.
 12. 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 佐原啓二, 安藤秀二, 大橋典男: つつが虫病および紅斑熱の迅速診断法の検討, 第 23 回, 2016 年 12 月 3-4 日.
 13. 蘇泓如, 伊藤圭祐, 河原崎泰昌, 島田雅彦, 大橋典男: アナプラズマ症診断のためのペプチド抗原利用の検討, 第 23 回リケッチア研究会(東京), 2016 年 12 月 3-4 日.
 14. 高本直矢, 田井仁, 佐藤寛子, 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 高田伸弘, 大橋典男: フタトゲチマダニの両性/単為生殖系統における共生細菌群の解析, 第 23 回リケッチア研究会(東京), 2016 年 12 月 3-4 日.
 15. 大橋典男, 高本直矢, 田井仁: マダニゲノムとアマプラズマ細菌を見る, 第 24 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI) 鹿児島大会, 2016 年 5 月 27 日-29 日.
 16. 蘇泓如, 呉東興, 伊藤圭祐, 河原崎泰昌, 大橋典男: ペプチドアレイを用いたアナプラズマ細菌 P44 抗原のエピトープマッピング, 第 24 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI) 鹿児島大会, 2016 年 5 月 27 日-29 日.
 17. 蘇泓如, 呉東興, 伊藤圭祐, 河原崎泰昌, 大橋典男: *Anaplasma phagocytophilum*

- specific P44 epitopes identified by peptide array analysis, 第 89 回日本細菌学会総会(大阪), 2016 年 3 月 23-25 日.
18. Ohashi N, Takamoto N, Wu D, Tai H: Whole genome shotgun sequencing of *Ixodes persulcatus* infected with *Anaplasma phagocytophilum* T162 (cutting-edge report), 第 22 回リケッチア研究会(東京), 2015 年 11 月 29-28 日.
 19. 大橋典男: アナプラズマ - 情報 update, 第 22 回リケッチア研究会(東京), 2015 年 11 月 29-28 日.
 20. 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 荒畑沙織, 酒井悠希子, 佐原啓二, 大橋典男: 静岡県における日本紅斑熱の疫学的考察, 第 22 回リケッチア研究会(東京), 2015 年 11 月 29-28 日.
 21. 大橋典男: アナプラズマ科細菌感染症に関する最近の話題について, 第 23 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI) 東日本大震災復興祈念大会(名取), 2015 年 6 月 26-28 日.
 22. 呉東興, 大橋典男, 烏日図, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 池ヶ谷朝香: 野生動物におけるリケッチア目細菌の分子疫学調査, 第 23 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI) 東日本大震災復興祈念大会(名取), 2015 年 6 月 26-28 日.
 23. 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 荒畑沙織, 佐原啓二, 大橋典男: One-tube nested PCR による *Orientia tsutugamushi* の検出, 第 23 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI) 東日本大震災復興祈念大会(名取), 2015 年 6 月 26-28 日.
 24. 池ヶ谷朝香, 荒畑沙織, 佐原啓二, 川森文彦, 大橋典男: 静岡県における SFTS ウイルスの浸淫実態, 第 23 回ダニと疾患のインタフェースに関するセミナー(SADI) 東日本大震災復興祈念大会(名取), 2015 年 6 月 26-28 日.
 25. 呉東興, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 池ヶ谷朝香, 川上万里, 岸本壽男, 森田裕司, 中堂園文子, 御供田睦代, 能勢裕久, 池田賢一, 増澤俊幸, 安藤秀二, 大橋典男: アナプラズマ症の特異抗体検出による患者探索の現状報告, 第 21 回リケッチア研究会 研究発表会(東京), 2014 年 12 月 20 日.
 26. 呉東興, 高娃, 吉川悠子, 川森文彦, 川上万里, 岸本壽男, 森田裕司, 増澤俊幸, 安藤秀二, 大橋典男: *Anaplasma phagocytophilum* 感染患者血清中に存在する抗体の検出法に関する検討, 第 97 回日本細菌学会関東支部総会(東京), 2014 年 10 月 31 日.
 27. 大橋典男: 日本国内に潜在する新興感染症「アナプラズマ症」, 平成 26 年度中部

地区獣医師大会・獣医学術中部地区学会特別公演(静岡), 2014 年 8 月 31 日.

28. Ohashi N, Yoshikawa Y, Gaowa, Wuritu, Wu D, Kawamori F: Tick-associated *Anaplasmataceae* pathogens in Japan., XIV International Congress of Acarology(京都), 2014 年 6 月 18 日.
29. 川森文彦, 大橋典男: わが国の新興アナプラズマ症, 衛生微生物技術協議会第 35 回研究会(東京), 2014 年 6 月 26-27 日.

〔図書〕(計 1 件)

1. 大橋典男: アナプラズマ症, 感染症診療とダニワールド, 臨床医学 eBook, *Infection*, シーニュ, 電子書籍(2016)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 典男 (OHASHI, NORIO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号: 2380361020

(2) 研究分担者

吉川 悠子 (Yoshikawa, Yoko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号: 3266950428